NARODOWY INSTYTUT LEKÓW
NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Houston, 20.12.2018

dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL
Zakład Biotechnologii Leków i Bioinformatyki
Narodowy Instytut Leków

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Eweliny Dobosz „Rola białka MCPIP-1 w regulacji homeostazy komórek nabłonkowych poprzez kontrolę ekspresji IL-8"

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Kozieł w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Prace eksperymentalne przedstawione w przedstawionej do oceny rozprawie zostały sfinansowane ze grantów NCN „Wyjaśnienie roli MCPIP-1 w mechanizmach regulacji wrodzonego systemu odporności podczas infekcji.", który był realizowany w latach 2012 - 2016, którego kierownikiem była promotor rozprawy dr hab. Joanna Kozieł, oraz z grantu Preludium „Ocena roli MCPIP-1 w regulacji procesu apoptozy neutrofili.", którego realizację zaplanowano na lata 2017-2019, którego kierownikiem jest mgr Ewelina Dobosz. Praca mgr Eweliny Dobosz była finansowana w ramach stypendium ze źródeł dotacji projakościowej i stypendium im. Jana Zurzyckiego finansowanego przez „Jagiellońskie Konsorcjum Naukowo-Biznesowe dla Badań Biomolekularnych i Komórkowych Cell-Mol-Tech" w ramach dotacji KNOW przyznanych jednostce macierzystej, Wydziałowi Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Część badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej została opublikowana w 2016 roku (**Dobosz E.** Wilamowski M. Lech M. Bugara B. Jura J. Potempa J. Koziel J.; MCPIP-1, Alias Regnase-1, Controls Epithelial Inflammation by Posttranscriptional Regulation of IL-8 Production. J Innate Immun

2016;8:564-578), a autorzy uzyskali zgodę wydawcy czasopisma na prezentację tych wyników w przedstawionej rozprawie

Rozprawa została zaprezentowana w klasycznej formie i zawiera standardowe części publikacji naukowej, czyli Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję wraz ze spisem literatury cytowanej w tekście, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wyodrębnionymi celami pracy i wnioskami końcowymi. Praca zawiera również spis treści, obszerną listę użytych skrótów, spis tabel i rycin.

Streszczenie bardzo dobrze podsumowuje założenia pracy i wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu. Jest napisane, tak jak cała reszta pracy, w bardzo przejrzysty sposób, który ułatwia czytelnikowi rozprawy na śledzenie skomplikowanej tematyki.

Wstęp jest dość obszerny (28 stron) i bardzo szczegółowo przedstawia mechanizmy związane z funkcjami nabłonka w ochronie tkanek gospodarza, jego rolą w występowaniu procesów zapalnych i procesie infekcji. Opisane zostały zarówno receptory warunkujące rozpoznawanie patogenów, przekazywanie sygnału w komórkach eukariotycznych jak i produkcja cząsteczek efektorowych przez nabłonek, ze szczególnym uwzględnieniem cytokin prozapalnych takich jak IL-8. Kolejny podrozdział Wstępu poświęcony jest zagadnieniom rekrutacji neutrofili i eliminacji infekcji. Autorka rozprawy wspomina, że jednym z czynników chemotaktycznych jest składnik C5a dopełniacza. *Mam w związku z tym pytanie, czy wiadomo czy anafilatoksyna C5a ma pośredni lub bezpośredni wpływ na poziom białka MCPIP-1 lub transkryptu kodującego MCPIP-1 w komórkach układu immunologicznego i/lub komórkach nabłonkowych?*

Jedyne czego w tej części mi zabrakło to pewien rodzaj podsumowania czy też usystematyzowania informacji w formie graficznej czy też tabelarycznej. Ponieważ zakres informacji uwzględnionych we wstępie jest bardzo szeroki, takie podsumowanie znacząco pomogłoby w szerszym ich przyswojeniu. W mojej opinii, wstęp po przeredagowaniu, dodaniu tabel czy też rycin, będzie świetnym polskojęzycznym artykułem przeglądowym dotyczącym homeostazy i procesów zapalnych toczących się w obrębie nabłonka. Taki artykuł z pewnością bardzo się przyda jako podsumowanie studentom, doktorantom, czy też innym osobom zainteresowanym tą tematyką.

Cel pracy jest jasno sformułowany i dotyczy kompleksowej oceny znaczenia białka MCPIP-1 dla procesów fizjologicznych i patologicznych toczących się w komórkach nabłonkowych. Z uwagi na to, że MCPIP-1 działa jako RNaza specyficznie degradująca transkrypty cytokin prozapalnych, takie jak: IL-6, IL-1β, doktorantka skoncentrowała swoje cele na badaniach dotyczących regulacji ekspresji IL-8 będącej

kluczową chemokiną produkowaną przez komórki nabłonkowe, warunkującą migrację fagocytów do tej tkanki.

Kolejnym rozdziałem rozprawy są **Materiały i Metody**. W swojej pracy doktorantka zastosowała szereg zróżnicowanych metod eksperymentalnych, które są szczegółowo opisane i pozwalają na pełne prześledzenie i ocenę wyników uzyskanych w pracy.

Rozdział **Wyniki** zawiera opis wykonanych eksperymentów i jest podzielony na dwie części. W pierwszej części autorka rozprawy zajmowała się badaniami dotyczącymi roli białka MCPIP-1 w regulacji ekspresji IL-8. W ramach wstępnych eksperymentów doktorantka porównała konstytutywną ekspresję MCPIP-1 w leukocytach i komórkach nabłonkowych na poziomie białka i transkryptu dla genu *MCPIP-1* i na tej podstawie opracowała ramy modelu badawczego stosowanego w pracy. Następnie zbadano, w jaki sposób ekspresja MCPIP-1 jest indukowana w komórkach HeLa w odpowiedzi na agonistów receptorów TLRs. W kolejnych eksperymentach zaprezentowanych w tej części pracy doktorantka wykazała rolę zmian poziomu ekspresji MCPIP-1 na wydzielanie IL-8. Autorka zastosowała różne metody wyciszania ekspresji i wykazała, że spadek poziomu ekspresji MCPIP-1 skutkuje wzrostem ilości IL-8 uwalnianej do podłoża hodowlanego. Doktorantka wykazała również, że wzrost poziomu MCPIP-1 w komórkach skutkuje spadkiem ilości uwalnianej IL-8. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że IL-8 jest główną chemokiną , której produkcja regulowana jest przez MCPIP-1 w różnych liniach komórek nabłonkowych.

Jednym z moim zdaniem ważniejszych wyników pokazanych w pracy jest pokazanie roli MCPIP-1 w regulacji ekspresji IL-8 podczas procesu infekcji bakteryjnej, oraz wielu poziomów regulacyjnych na których zachodzi ten proces. Doktorantka pokazała, że transkrypt dla IL-8 jest celem aktywności RNAzowej MCPIP-1, ale również, że MCPIP-1 może odpowiadać za regulacje poziomu IL-8 na drodze zmiany aktywacji NF-κB.

Z drobnych uwag dotyczących tej części, rycina 9E pokazuje, że różnica pomiędzy poziomem IL-8 dla próbek NK i siRNA1 jest nieistotna statystycznie, podczas gdy dla siRNA2 zaznaczone jest $p<0.05$. Na moje oko, poziom IL-8 w próbce siRNA2 jest niższy, a słupek błędu wyższy niż w próbce siRNA1. Czy wartości p zostały prawidłowo zaznaczone na wykresie?

Na zakończenie pierwszej części Wyników, doktorantka prezentuje doświadczenie wskazujące, że nie dochodzi do nadprodukcji białka MCPIP-1 po stymulacji IL-8, a poziom tran skryptu nie ma związku z poziomem/czasem stymulacji, co powodowałoby pogłębienie efektu antyzapalnego i dalsze

uniewrażliwienie komórek nabłonka. *Mam w związku z tym pytanie, czy wiadomo czy ma może miejsce sytuacja odwrotna, czyli czy spadek poziomu/degradacja IL-8 będzie prowadziła do zmian w poziomie ekspresji MCPIP-1?* Pytanie to ma związek z drugą częścią prezentowanych wyników, które dotyczą wpływu infekcji bakteryjnej komórek nabłonka na MCPIP-1.

W komórkach nabłonkowych dochodzi do spadku poziomu MCPIP-1, co warunkuje wzrost ekspresji IL-8. Doświadczenia przedstawione w rozprawie, mające na celu identyfikację mechanizmu prowadzącego do obniżenia poziomu białka MCPIP-1 wykazały, że obserwowany fenomen nie jest skutkiem zahamowania syntezy *de novo*, regulacji poziomu transkryptu, czy proteolizy białka MCPIP-1 wywołanej obecnością enzymów bakteryjnych. Wykazano natomiast, że infekcja angażuje w komórkach nabłonkowych mechanizm degradacji proteasomalnej oraz aktywuje parakaspazę MALT-1 (ang. mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1), dla której MCPIP-1 stanowi substrat, co skutkuje spadkiem poziomu badanego białka. Doktorantka wykazała, że degradacja MCPIP-1 wywołana infekcją jest procesem przejściowym, który prowadzi do gwałtownej sekrecji IL-8, a tym samym uruchomienia mechanizmów sprzyjających eliminacji zakażenia.

W swoich doświadczeniach doktorantka wykazała, że MCPIP-1 jest regulowany specyficznie w zależności od rodzaju bakterii. Wpływ infekcji na spadek poziomu MCPIP-1 został wykazany dla *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Porphyromonas gingivalis*, lecz nie dla bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Streptococcus sanguinis*). Czy różnica w odpowiedzi komórek na bakterie może mieć związek z kodowaniem przez niektóre bakterie Gram-dodatnie specyficznych proteaz, które inaktywują IL-8. Np. taki mechanizm unikania komórek układu immunologicznego rekrutowanych do miejsca infekcji przez gradient IL-8 opisano dla *Streptococcus pyogenes*. Ten Gram-dodatni patogen koduje proteazę SpyCEP, która specyficznie inaktywuje IL-8,oraz ScpA specyficzną w stosunku do składnika C5a dopełniacza. *Czy u S. ureus, i inne użyte w doświadczeniach bakterie Gram-dodatnie, kodują podobnie działające enzymy, które mogą być odpowiedzialne za selektywną degradację IL8, IL6 i innych celów dla MCPIP-1, które w efekcie mogą wpływać na poziom jego ekspresji? Dodatkowo, czy różnice pomiędzy różnymi bakteriami w stosunku do ich zdolności do modyfikacji poziomu MCPIP-1 mogą wynikać z różnic pomiędzy szczepami określonego gatunku, a nie gatunkami?* Np. w przypadku *E. coli* opisano szereg typów różniących się między sobą wirulencją i właściwościami. *Czy wiadomo czy różne wirotypy E. coli będą miały podobny wpływ na komórki eukariotyczne jak np. Caco-2?*

Ciekawe są też próby identyfikacji ścieżki przekazywania sygnału o infekcji przez receptory TLR. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń pokazano, że zablokowanie receptoraTLR4 wraz z równoczesną stymulacją komórek LPS, nie powoduje istotnych zmian poziomu MCPIP-1 co wyklucza rolę aktywacji TLR4 w badanym procesie. W wynikach przedstawionych w początkowej części pracy doktorantka pokazuje, że użycie syntetycznego odpowiednika podwójnej nici RNA, który jest ligandem dla receptora TLR3, wywołuje zwiększoną ekspresję transkryptu MCPIP-1. *Czy aktywacja przekazywania sygnału przez receptor TLR3 może mieć jakiś związek z aktywnością RNAzową MCPIP-1?*

Uzyskane przez doktorantkę w rozdziale Wyniki są ważne i poszerzają stan wiedzy na temat roli MCPIP-1 w procesie zapalnym i obronie nabłonka przed zakażeniem. Zaprezentowane doświadczenia wskazują iż białko MCPIP-1 odgrywa szeroką rolę w funkcjonowaniu komórek nabłonkowych i regulacji ich odpowiedzi zapalnej, wpływając m. in. na ekspresję IL-8. Zaprezentowane w niniejszej pracy badania wskazują, że białko MCPIP-1 należy zakwalifikować jako istotne w utrzymaniu homeostazy nabłonka w warunkach fizjologicznych oraz kontroli rozwijającego się stanu zapalnego w odpowiedzi na infekcję.

W **Dyskusji** doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki i w dojrzały sposób omawia je w odniesieniu do literatury. Dyskusja jest obszerna i prezentuje uzyskane wyniki w szerokim aspekcie literaturowym. We **Wnioskach Końcowych** doktorantka podsumowuje najważniejsze odkrycia zaprezentowane w rozprawie:

1. Białko MCPIP-1, będące negatywnym regulatorem stanu zapalnego ulega wysokiej, konstytutywnej ekspresji w komórkach nabłonkowych, w ten sposób zapobiegając jego nadpobudliwości i umożliwiając utrzymanie homeostazy.

2. Interleukina-8, jedna z najważniejszych chemokin produkowanych przez nabłonek, której głównym zadaniem jest przyciąganie profesjonalnych fagocytów do miejsca infekcji w celu eliminacji zakażenia, jest regulowana przez MCPIP-1 dwutorowo. Transkrypt tej chemokiny tworzy w regionie 3'UTR charakterystyczne motywy spinki rozpoznawane przez rybonukleazę MCPIP-1, co skutkuje jego degradacją. Jednocześnie dzięki funkcji deubikwitynazowej badane białko negatywnie reguluje szlak przekazu sygnału NF-κB, od którego zależy produkcja IL-8.

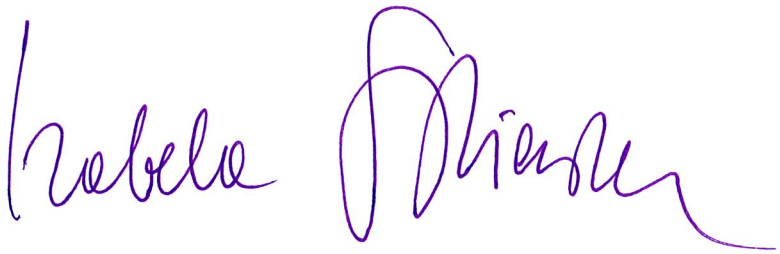
3. Infekcja komórek nabłonkowych bakteriami Gram-ujemnymi powoduje obniżenie poziomu białka MCPIP-1, przez co możliwa jest wzmożona produkcja cytokin i chemokin prozapalnych przez te komórki, która ma skutkować eliminacją zagrożenia.

4. Mechanizmami odpowiedzialnymi za spadek poziomu białka MCPIP-1 w kontakcie nabłonka z patogenami są zarówno degradacja proteasomalna, jak i proteolityczna katalizowana przez białko MALT-1.

Podsumowanie

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pani magister Eweliny Dobosz w powstanie rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o dopuszczenie pani magister Eweliny Dobosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego i składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.



Dr hab. Izabela Sitkiewicz